

Proteasen und ihre Hemmbarkeit durch Proteasen-Inhibitoren in purulenten Exsudaten

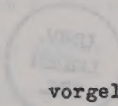
Wolfgang Heribert Ellgas

1976

Aus dem biochemischen Laboratorium der Hals- Nasen-
Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

PROTEASEN UND IHRE HEMMBARKEIT DURCH PROTEASEN-
INHIBITOREN IN PURULENTEN EXSUDATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Wolfgang Heribert Ellgas

aus

München

Jahr

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: ..26..Okt..1976



Inhaltsverzeichnis

A) Kurze einführende theoretische Grundlagen

- 1) Proteasen allgemein
- 2) Leukozytenproteasen und ihre Funktion bei der Entzündung
- 3) Hemmung durch Proteaseninhibitoren

B) Zielsetzung

C) Ergebnisse

- 1) Fraktionierung des purulenten Materials
- 2) Die Verteilung der proteolytischen Aktivität
 - a) im alkalischen Bereich
 - b) im sauren Bereich
- 3) Hemmbarkeit der proteolytischen Aktivität
 - a) mit niedermolekularem Bronchialsekret-Inhibitor im Alkalischen
 - b) im Säuren
 - c) mit verschiedenen Inhibitoren

D) Beschreibung der Versuche

- 1) Säulenchromatographie mit Cellulose
 - a) p-Cellulose
 - b) DEAE-Cellulose
- 2) Säulenchromatographie mit Sephadex
 - a) DEAE-Sephadex
 - b) Sephadex G-100
 - c) CM-Sephadex

3) Säulenchromatographie mit Sephadex, jedoch mit unzentri-
fugiertem Ausgangsmaterial

4) Hemmkurven

E) Material und Methoden

1) Proteasen

2) Säulenchromatographie

3) Dialyse

4) Inhibitorbestimmung

5) Aktivitätsbestimmung

a) Azocaseintest

b) Hämoglobintest

6) Eiweißstandard

7) Erstellung von Hemmkurven

8) Inhibitormodifikation

F) Zusammenfassung

G) Diskussion

A) Einleitung

1) Proteasen allgemein

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Sie werden eingeteilt in Endopeptidasen (Proteasen) und Exopeptidasen (Peptidasen). Der Angriff der Endopeptidasen erfolgt an Peptidbindungen innerhalb des Moleküls, während die Exopeptidasen nur die endständigen Aminosäuren lösen.

Sekretorische Endopeptidasen wie Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin werden in Magenschleimhaut und Pankreas als inaktive Vorstufen gebildet und in das Magen-Darm-Lumen sezerniert (1).

Dagegen sind die intrazellulären Endopeptidasen, die Kathepsine, in den Lysosomen der Zellen lokalisiert. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Hydrolyse phagozytisierten Eiweißes oder funktionslos gewordener Zellbestandteile. Dieser Vorgang läuft in erheblichem Ausmaß bei der Infektabwehr durch Leukozyten ab.

2) Leukozytenproteasen und ihre Funktion bei der Entzündung

Die Kathepsine der Leukozyten können nach verschiedenen Kriterien, wie pH-Optimum, elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit, Molekulargewicht und hydrolytischer Aktivität gegenüber verschiedenen Proteinen eingeteilt werden (2).

Zur Abwehr körperfremder Eiweiße stehen dem Organismus zum einen die Granulozyten und Monozyten, die beide zur Phagozytose befähigt sind, zur Verfügung. Zum anderen produzieren Lymphozyten und Plasmazellen Antikörper. Bei der Entzündung wird durch aktivierte Gewebsproteasen das Kallikrein-Kinin-System, das die Entzündung fördert, in Gang gesetzt (3).

Einen zusätzlichen Reiz bilden die Proteasen zerfallender Leukozyten und freiwerdende Bakterienproteasen. Kinine fördern die Vasodilatation und steigern die Kapillarpermeabilität. Dadurch können Leukozyten in das entzündete Gewebe diffundieren und bilden dort Eiter (4).

3) Hemmung durch Proteaseninhibitoren

Proteaseninhibitoren sind Proteine, die unter Bildung von Komplexen Proteasen zu hemmen vermögen. Da die Proteasen das physiologische Gleichgewicht verschieben, benötigt der Organismus die Inhibition derselben, um dieses Gleichgewicht wieder herzustellen. Einer der bekanntesten Inhibitoren des Serums ist das α_1 -Anti-Trypsin. Es hemmt Leukozytenproteasen (7,10) und übt so bei massiven Leukozytenmobilisierungen eine außerordentlich wichtige Schutzfunktion im Kreislaufsystem aus. Ein für Nasenschleimhaut spezifischer Inhibitor wurde im Arbeitskreis Hochstraßer gefunden (5).

Alpha₁-Anti Trypsin ist ein Glykoprotein (6) mit einem MG von 45 000. Der Anteil der Hemmkapazität gegenüber Trypsin beträgt etwa 90 % (8). Als polyvalenter Inhibitor hemmt es ferner Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin und Elastase (9).

Auch der niedermolekulare Inhibitor (MG 14 000) der Bronchialschleimhaut ist polyvalent; er hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Pronase und Leukozytenproteasen (10).

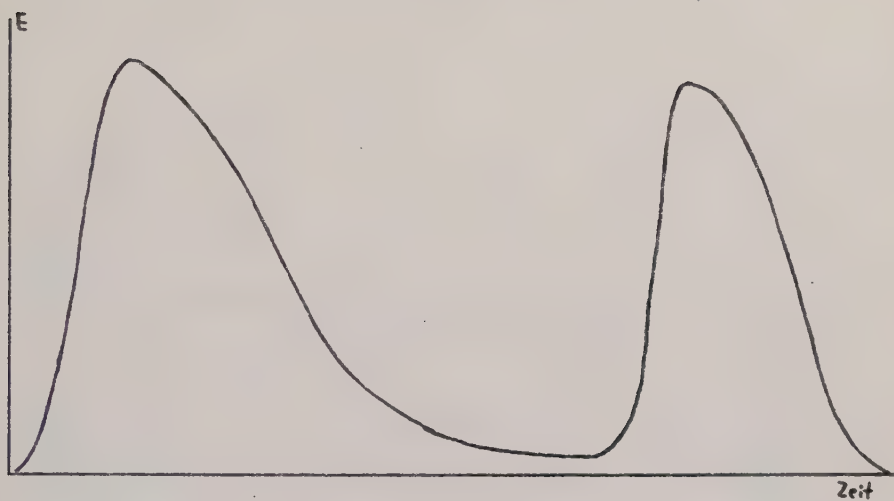
B) Zielsetzung

Im Bereich der oberen Luftwege wurde im Arbeitskreis Hochstraßer ein niedermolekularer Inhibitor gefunden, dessen Aufgabe der bisher allein dem α_1 -Anti-Trypsin zugeschriebene Schutz der Schleimhaut vor Proteasen ist. Bekannt ist die Hemmung proteolytischer Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pronase (5), ferner die Hemmung leukozytärer Proteasen (11).

Der Arbeitskreis Hochstraßer sucht nach weiteren Inhibitoren, die Leukozytenproteasen zu hemmen vermögen, da sowohl α_1 -Anti-Trypsin als auch der niedermolekulare Bronchialsekretinhibitor schwer zu gewinnen sind. Ein leicht zu gewinnender Inhibitor wäre therapeutisch bei pathologischen Zuständen der Atemwege, insbesondere der Nasenschleimhaut, von großer Bedeutung.

Um Aussagen über die Hemmfähigkeit verschiedener Inhibitoren auf Proteasen aus purulenten Sekreten zu erhalten, ist es von Interesse, diese Proteasen anzureichern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Proteasen aus purulenten Sekreten in gereinigter Form mit verschiedenen Proteaseninhibitoren auf ihre Hemmbarkeit zu prüfen. Dabei wurden purulente Exsudate verschiedener Patienten, d.h. ohne Rücksicht auf die Art der Entzündung, verwendet. Es ist also zu beachten, daß es sich bei dem untersuchten Material nicht nur um Leukozytenproteasen, sondern auch um Proteasen zerstörten Gewebes (wie es vor allem bei chronischen Entzündungen vorkommt) und um Bakterienproteasen handelt.

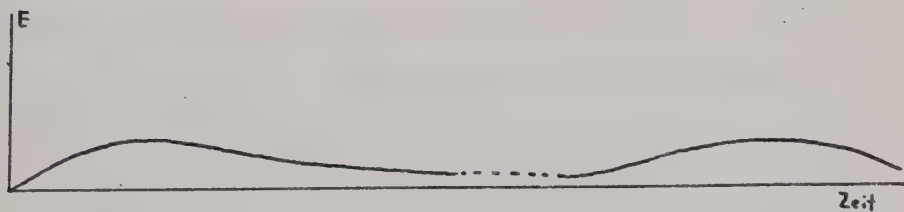
p-Cellulose
(übertragene Uvicord-Kurve)



L-I

Elutionspuffer 0,05m Borat pH 6,5

L-II

0,05m Borat; 0,1n NaCl;
pH 6,5

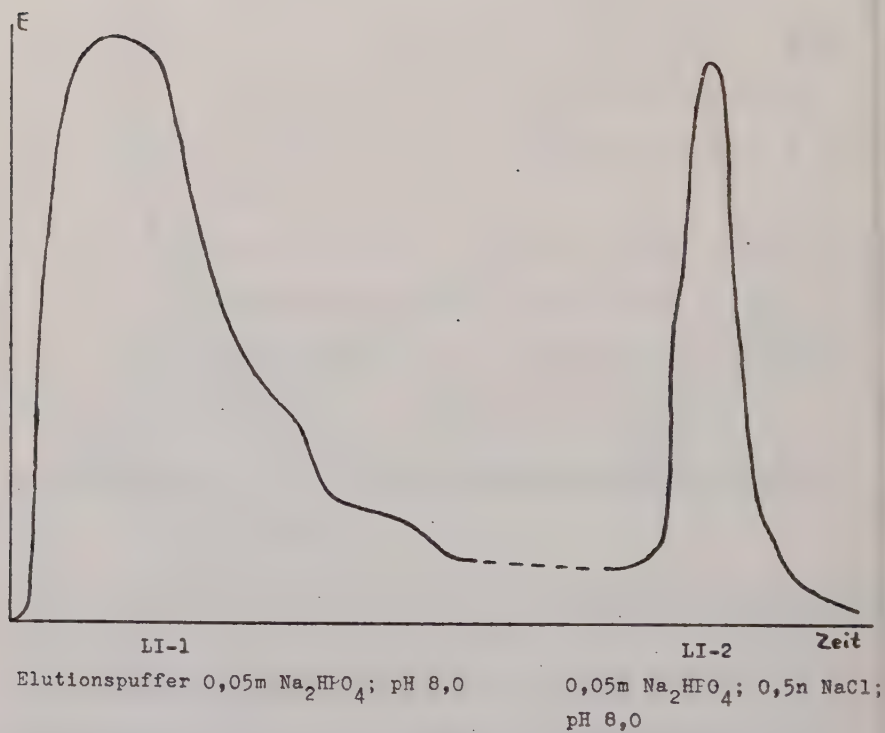
L-III

0,05m Borat; 0,5n NaCl; pH 7,0

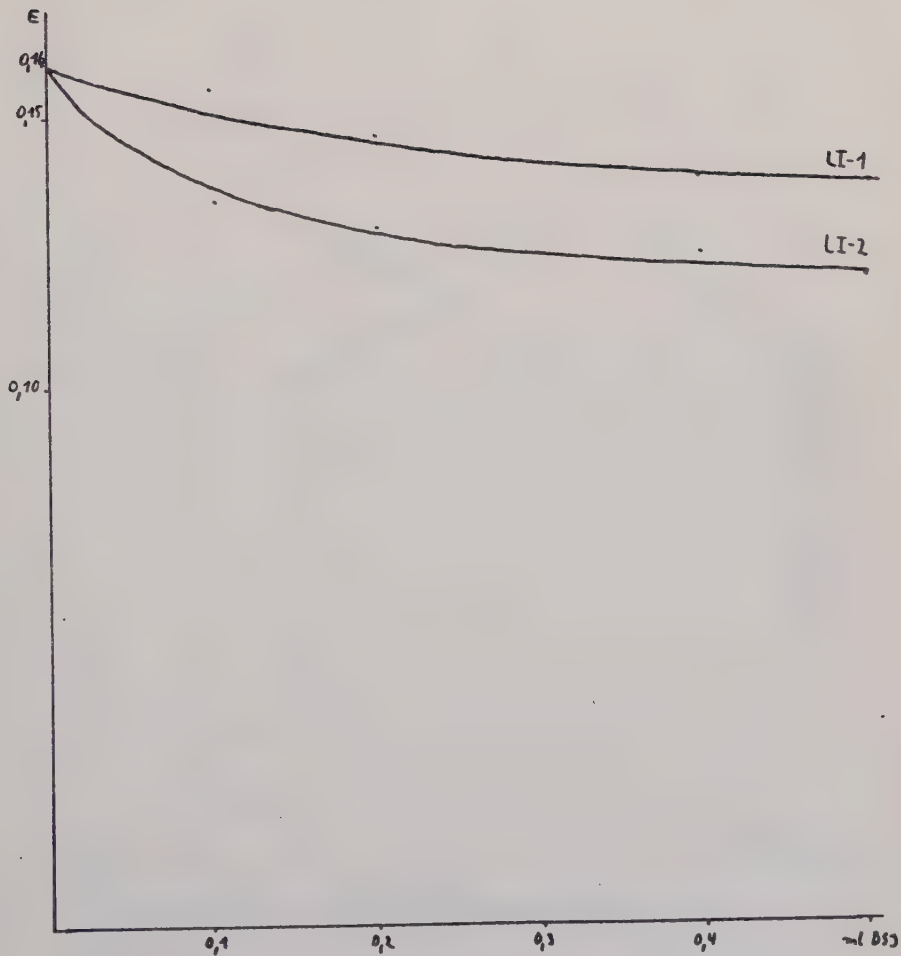
L-IV

0,05m Borat; 1,0n NaCl;
pH 8,0

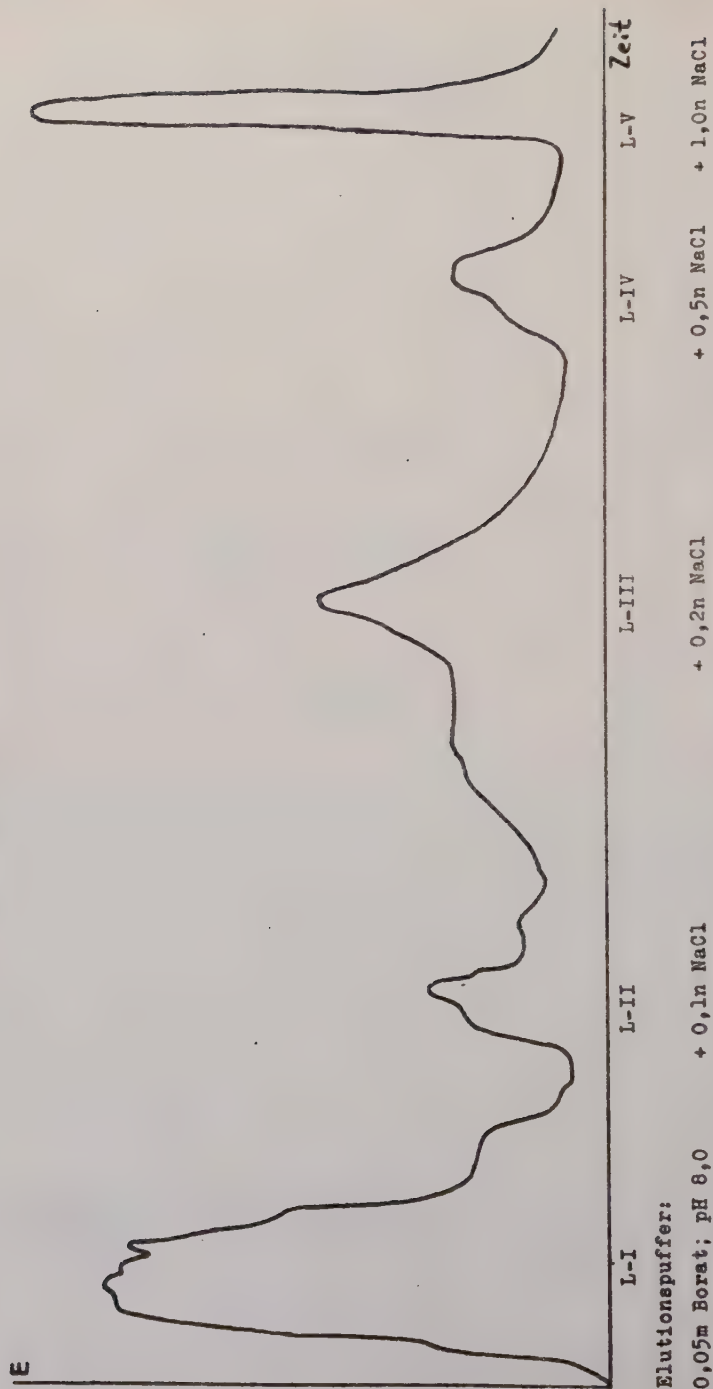
DEAE-Cellulose
(Übertragene Uvicord-Kurve)



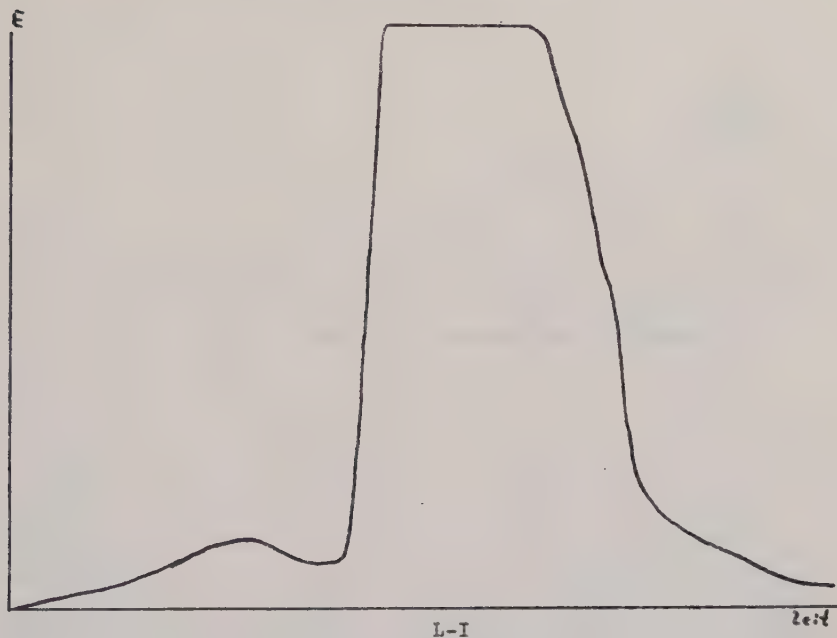
DEAE-Cellulose
Azocasein pH 7,8
BSI 51,2 ImU/ml



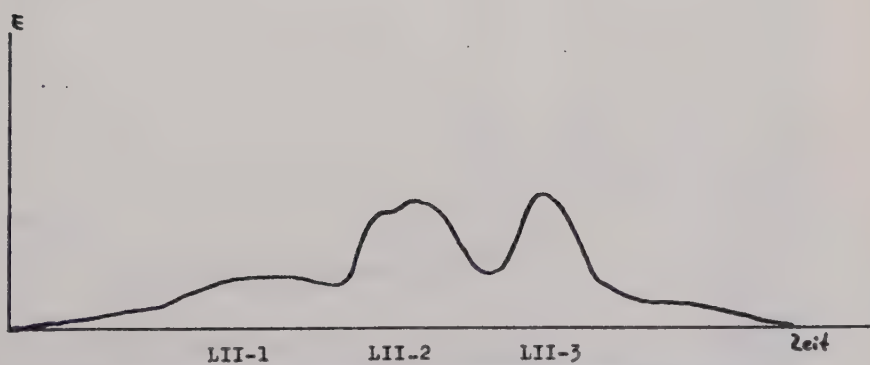
DEAE-Sephadex
(Übertragene Uvicord-Kurve)



Sephadex G-100
(Übertragene Uvicord-Kurve)

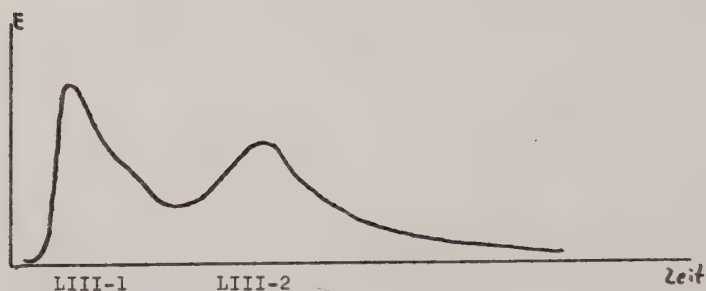


Elutionspuffer 0,05m Borat; 0,1n NaCl; pH 7,5

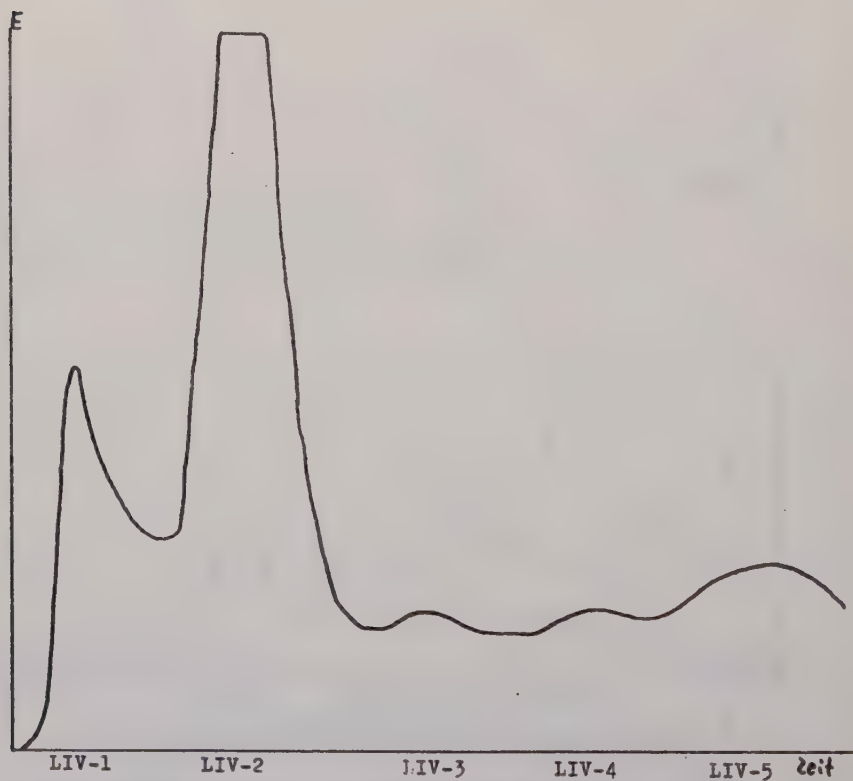


Elutionspuffer 0,05m Borat; 0,1n NaCl; pH 7,5

Sephadex G-100
(Übertragene Uvicord-Kurve)

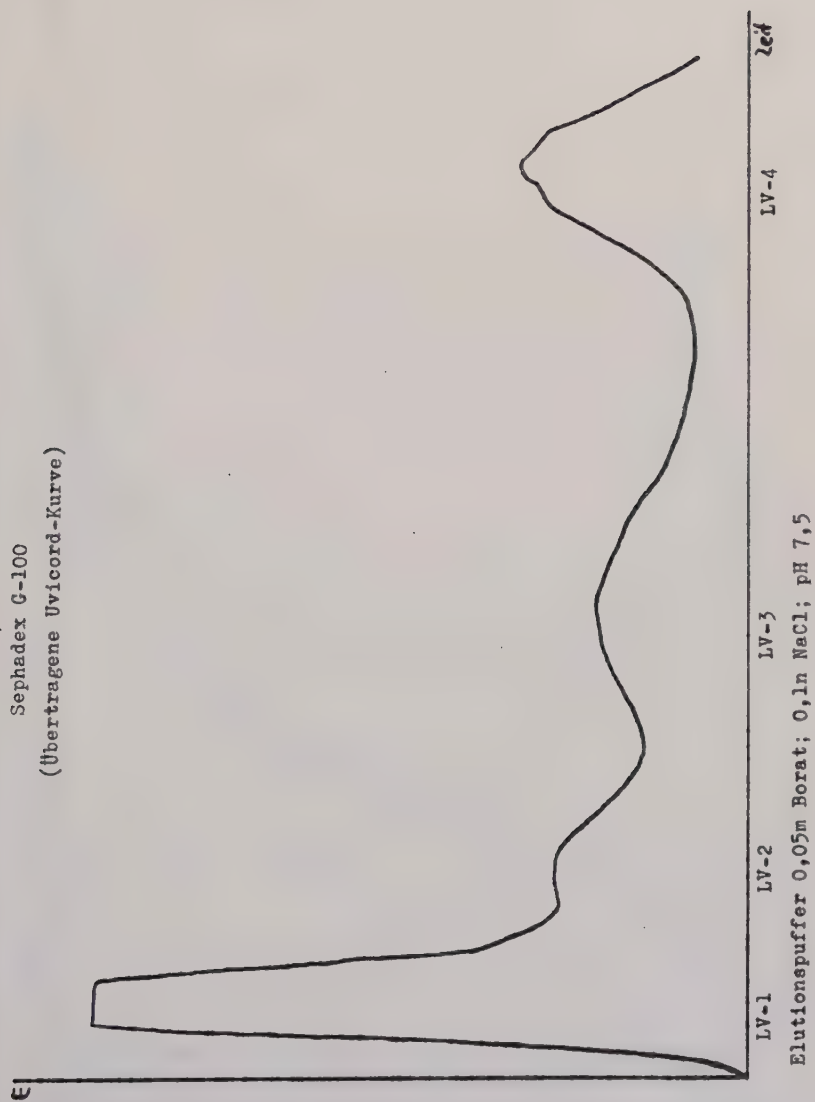


Elutionspuffer 0,05m Borat; 0,1n NaCl; pH 7,5

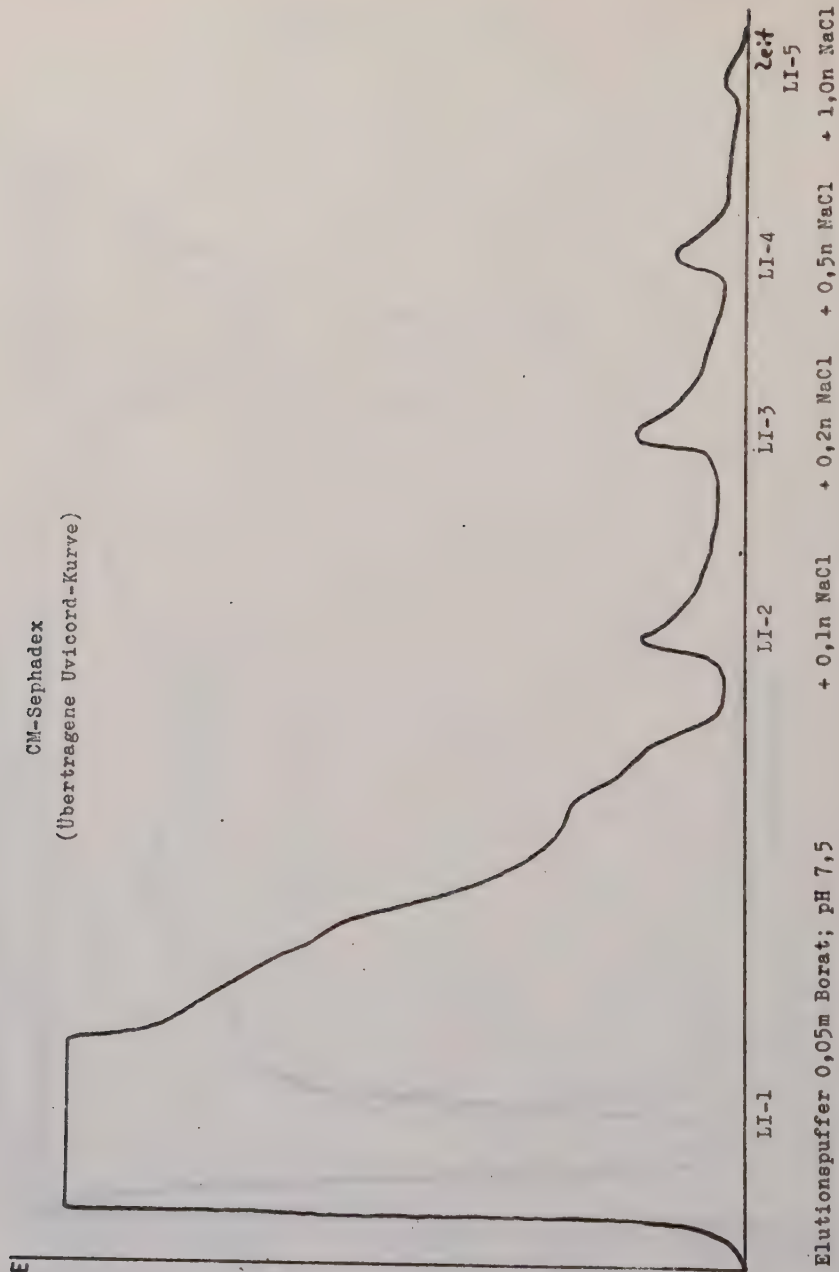


Elutionspuffer 0,05m Borat; 0,1n NaCl; pH 7,5

Sephadex G-100
(Übertragene Uvicord-Kurve)



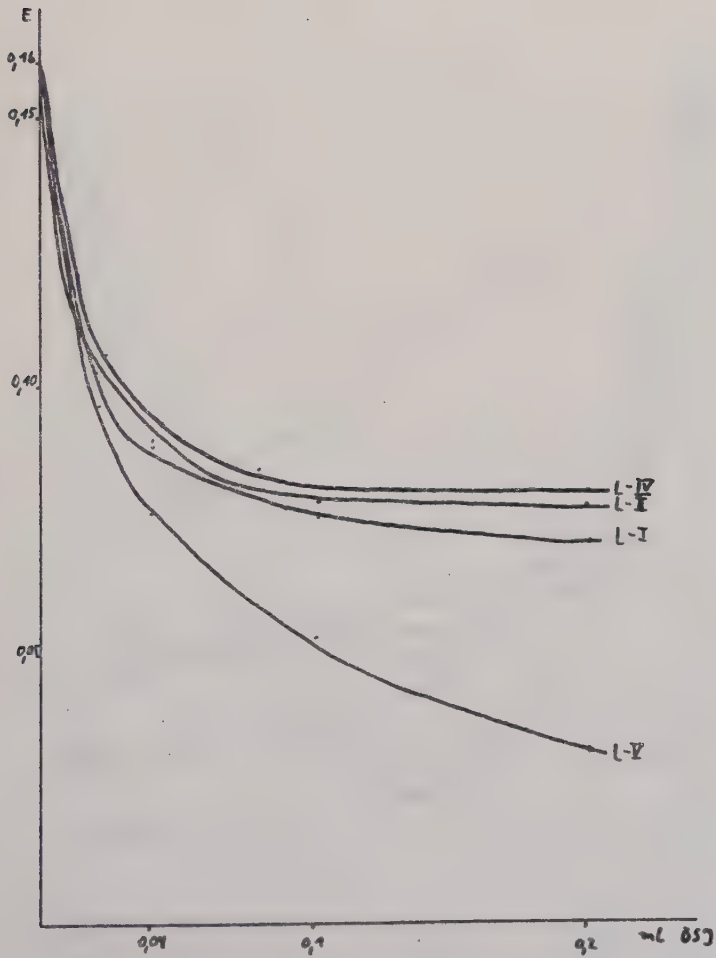
CM-Sephadex
(Übertragene Uvicord-Kurve)



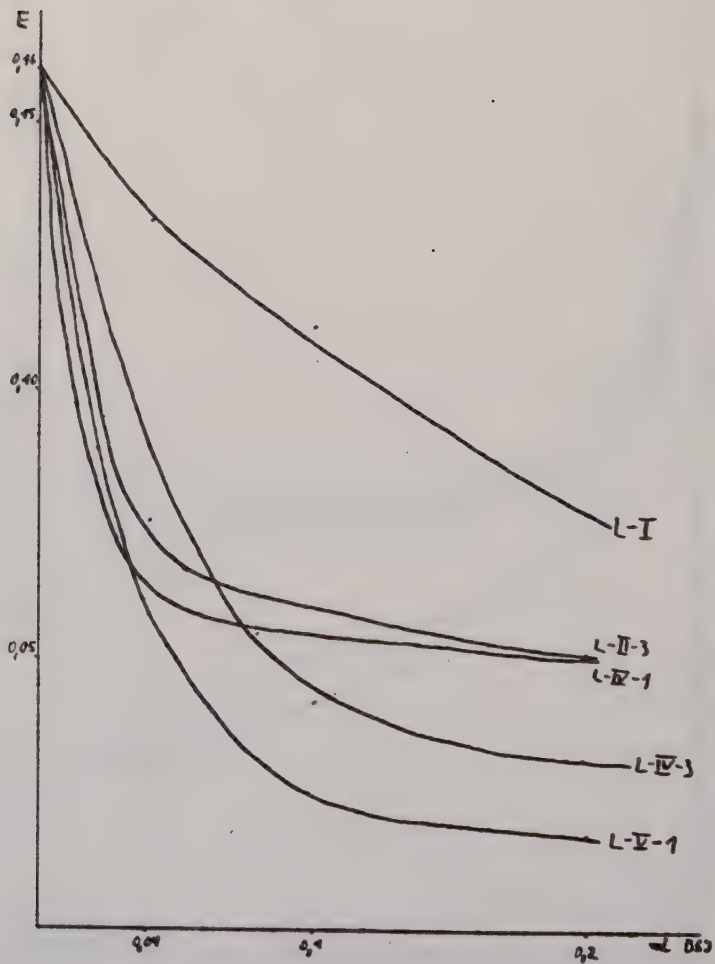
Hämoglobin pH 7,5

BSI 96,5 ImU/ml

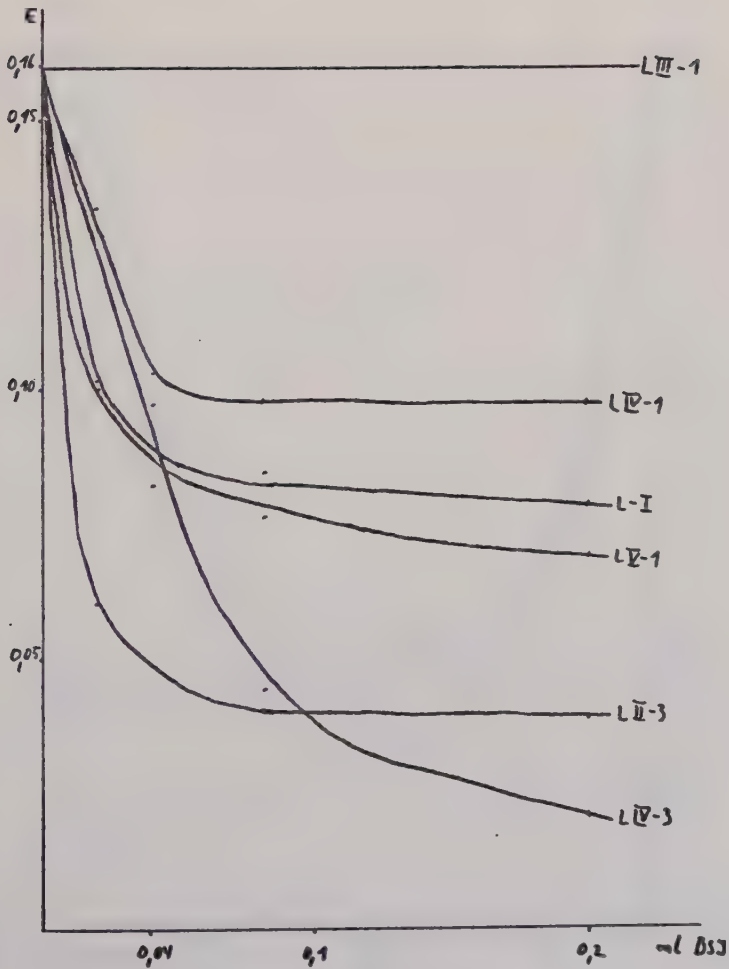
†



Azocasein pH 7,8
BSI 96,5 ImU/ml

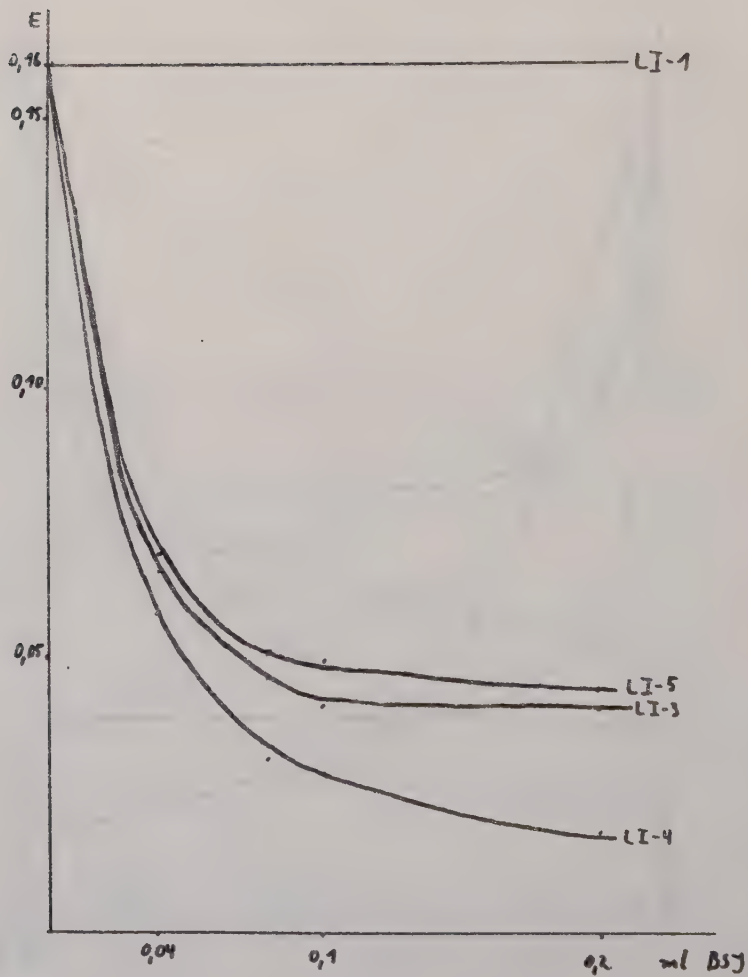


Hämoglobin pH 7,5
BSI 96,5 ImU/ml



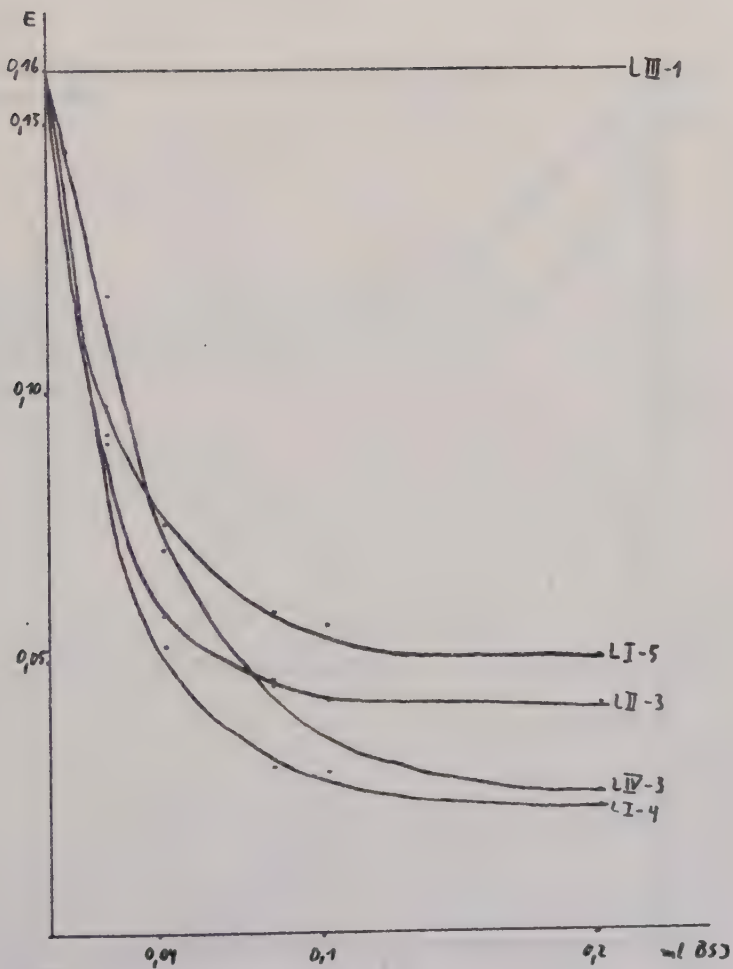
Hämoglobin pH 7,5

BSI 105 ImU/ml

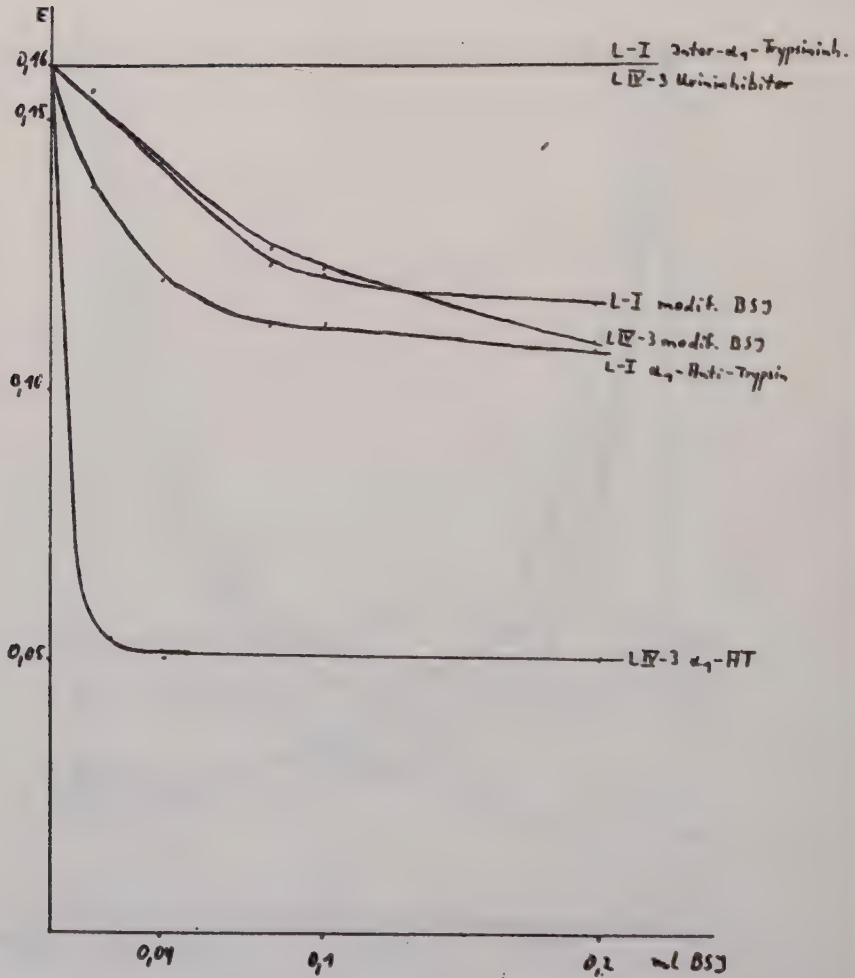


Hämoglobin pH 5,5

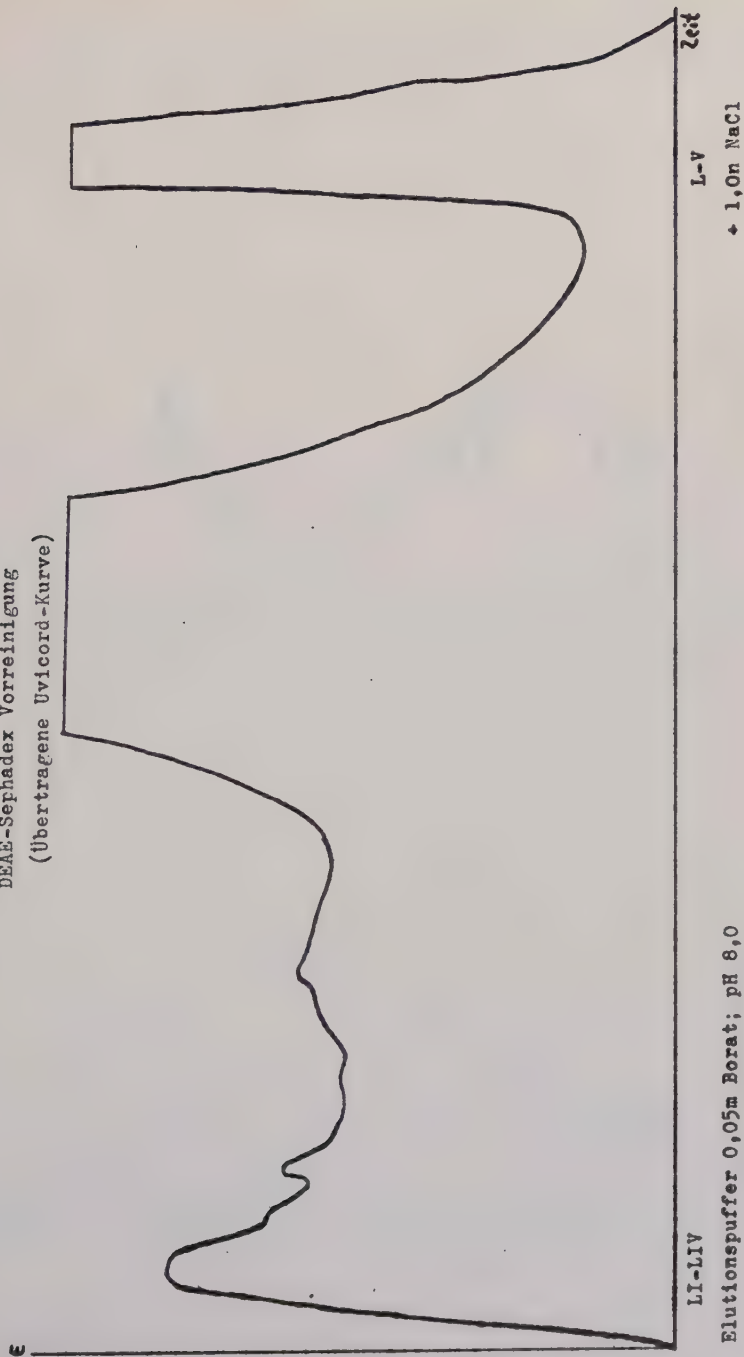
ESI 95 ImU/ml



Hämoglobin pH 7,5
 Inter- α_1 -Trypsininhibitor 81,7 ImU/ml
 Urininhibitor 72 ImU/ml
 α_1 -Anti-Trypsin 79 ImU/ml
 mit Maleinsäureanhydrid modifizierter RSI 26 ImU/ml



DEAE-Sephadex Vorreinigung
(übertragene Uvicord-Kurve)



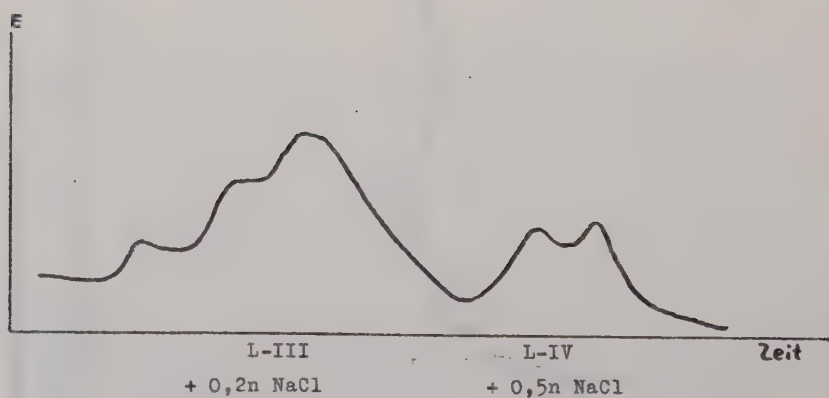
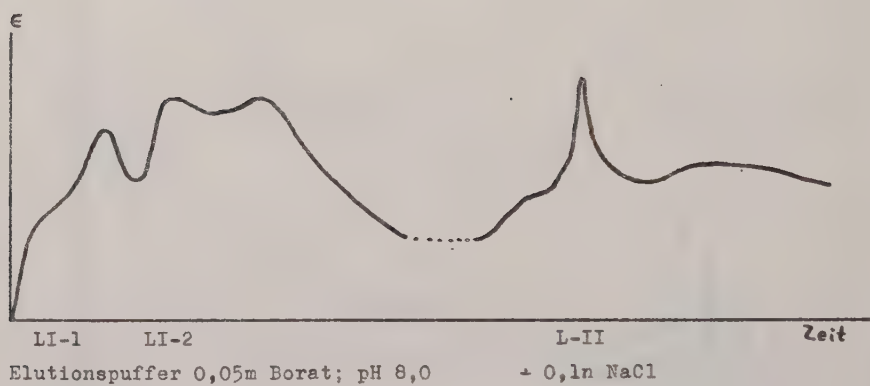
LI-LIV

L-V

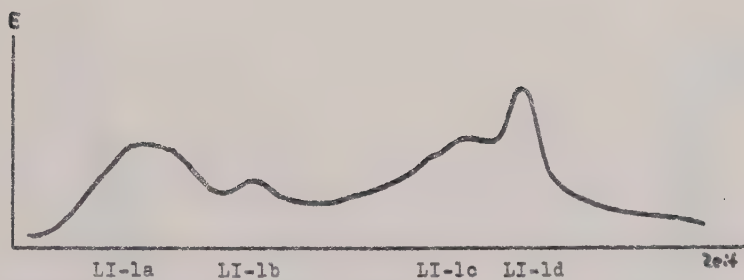
Elutionspuffer 0,05m Borat; pH 8,0

+ 1,0n NaCl

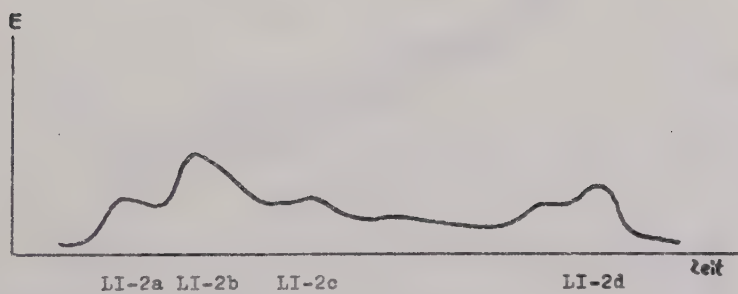
DEAE-Sephadex
(übertragene Uvicord-Kurve)



Sephadex G-100
(Übertragene Uvicord-Kurve)



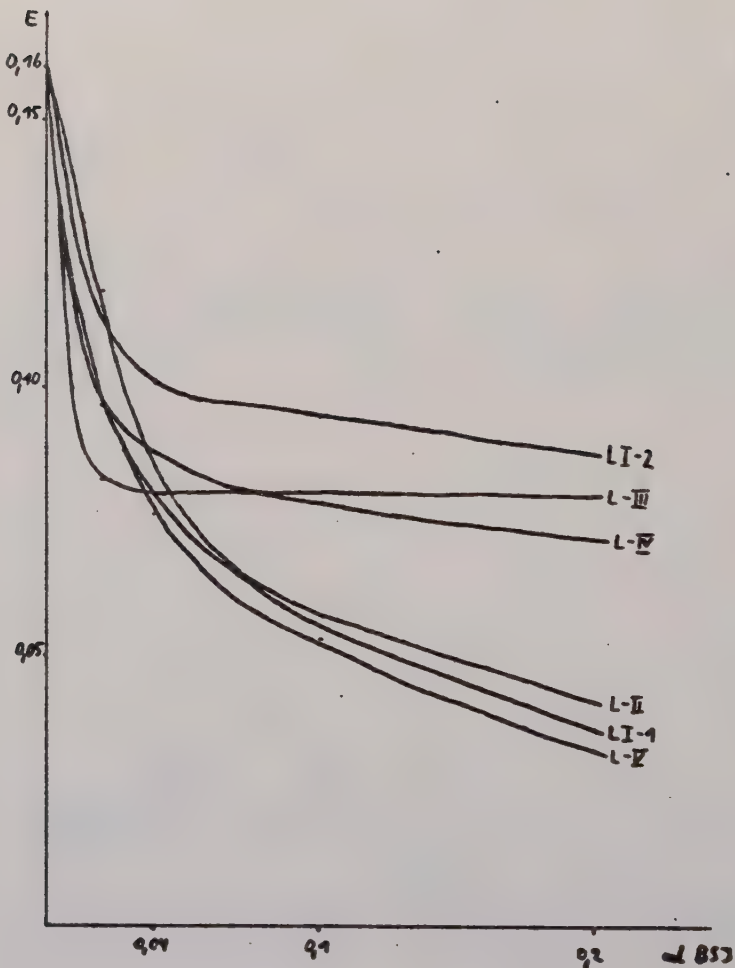
Elutionspuffer 0,05m Borat; pH 8,0



Elutionspuffer 0,05m Borat; pH 8,0

Hämoglobin pH 7,5

BSI 97 ImU/ml



Hämoglobin pH 7,5

BSI 90,7 ImU/ml

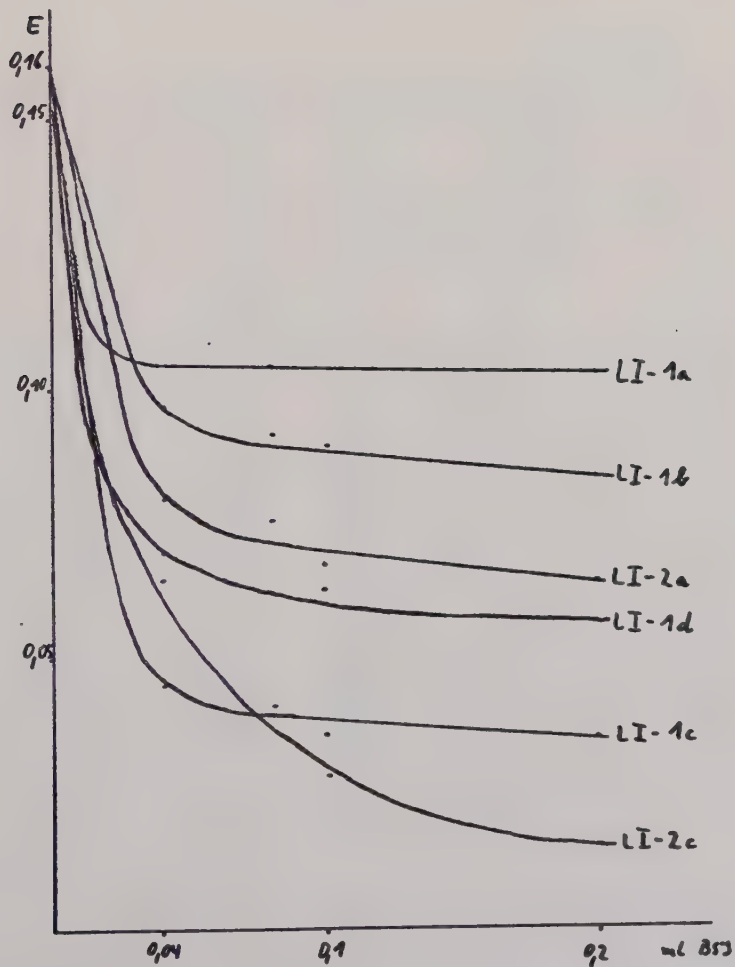


Tabelle 1

Azocaseintest:

4,0mg Protease; 1 std. bei 37° C; E₃₆₆ gegen Leerwert

Puffer: TRA-Puffer pH 7,8

0,1m Citrat pH 5,5

Hämoglobintest:

4,0mg Protease; 1 std. bei 37° C; im Ultravioletten E₂₈₀
gegen Leerwert

Puffer: TRA-Puffer pH 7,8

0,1m Citrat pH 5,5

	Azo	Hb(UV)	Hb/Azo	Hb 7,8/5,5
pH 7,8 L-I	0,066	0,218	3,30	2,18
L-II	0,206	0,985	3,79	2,52
L-III	0,290	0,941	3,24	2,11
L-IV	0,200	0,495	2,48	3,64
L-V	0,126	0,059	0,47	0,82
pH 5,5 L-I	0,034	0,100	3,00	1,95
L-II	0,111	0,383	3,45	2,32
L-III	0,135	0,446	3,31	2,14
L-IV	0,118	0,136	1,28	1,71
L-V	0,071	0,072	1,01	1,79

Tabelle 2

Hämoglobintest:

0,1ml Protease; 2 std. bei 37° C; E₅₇₈ gegen Leerwert

Puffer: 0,05m Borat pH 7,5

0,1m Citrat pH 5,5

	pH 7,5	pH 5,5	Eiweiß/0,1ml	7,5/5,5
LI	0,145	0,068	0,578 mg	2,12
LII-1	0,005	0,000	0,013 "	
LII-2	0,018	0,016	0,238 "	1,12
LII-3	0,030	0,008	0,388 "	3,75
LIH-1	0,030	0,014	0,773 "	2,14
LIH-2	0,027	0,019	0,435 "	1,42
LIV-1	0,054	0,015	0,825 "	3,60
LIV-2	0,048	0,020	5,103 "	2,40
LIV-3	0,295	0,042	0,086 "	7,02
LIV-4	0,085	0,013	0,028 "	6,52
LIV-5	0,005	0,021	0,013 "	0,24
LV-1	0,071	0,024	1,000 "	3,00
LV-2	0,012	0,015	0,305 "	0,80
LV-3	0,010	0,015	0,158 "	0,67

Fortsetzung Tabelle 2

Azocaseintest:

0,1ml Protease; 2 std. bei 37° C; E₃₆₆ gegen Leerwert

Puffer: TRA-Puffer pH 7,8

0,1m Citrat pH 5,5

	pH 7,5	pH 5,5	7,8/5,5
LI	0,050	0,025	2,0
LII-3	0,038	0,027	1,4
LIV-1	0,076	0,037	2,1
LIV-3	0,140	0,062	2,3
LV-1	0,249	0,074	3,4

Tabelle 3

Hämoglobintest:

3 std. bei 37° C; E₅₇₈ gegen Leerwert

Puffer: 0,05m Borat pH 7,5

	Menge (mg)	E	E/mg/std.
LI-1	2,2	0,259	0,039
LI-2	0,2	0,076	0,050
LI-3	0,5	0,755	0,503
LI-4	0,5	0,561	0,374
LI-5	0,7	0,654	0,311

Tabelle 4

Hämoglobintest:

0,9mg Protease; 3 std. bei 37° C; E₅₇₈ gegen Leerwert

Puffer: 0,05m Borat pH 7,5

LI-1	0,785
LI-2	0,186
L-II	0,150
L-II	0,053
L-IV	0,017
L-V	0,029

Tabelle 5

Hämoglobintest:

0,8mg Protease; 5 std. bei 37° C; E₅₇₈ gegen Leerwert

Puffer: 0,05m Borat pH 7,5

	Menge (mg)	E	E/mg/std.	vorh.Menge/mg
LI-1a	0,80	0,097	0,024	32,6
LI-1b	0,13	0,160	0,246	5,5
LI-1c	0,06	0,053	0,160	2,3
LI-1d	0,02	0,047	0,470	0,9
LI-2a	0,10	0,140	0,280	4,1
LI-2b	0,35	0,074	0,042	14,1
LI-2c	0,13	0,238	0,365	5,0
LI-2d	zu geringe Menge			

C) Ergebnisse

1) Fraktionierung des purulenten Materials

Der aus Kiefernebenhöhlen gewonnene Eiter wird in ein zur Chromatographie geeignetes Konzentrat verarbeitet (s. Kapitel E). Dieses läßt sich mittels verschiedener Trennverfahren in zahlreiche Fraktionen aufteilen. Die Proteasen, die durch Reinigung an Cellulose (Abb. 1,2) gewonnen werden können, sind für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit ungeeignet, da sie durch Bronchialsekretinhibitor (BSI) nur geringfügig hemmbar sind (Abb. 3). Gut hemmbare und hochaktive Proteasen dagegen erhält man mittels Fraktionierung an Sephadex. Nach schrittweiser Reinigung an DEAE-Sephadex (Abb. 4, 13,14) und CM-Sephadex (Abb. 6) bzw. Sephadex G-100 (Abb. 5,15) lassen sich mehrere hochaktive Proteasenkonzentrate gewinnen, die bis zu 90 % hemmbar sind.

2) Die proteolytische Aktivität bei verschiedenen pH-Bereichen

a) im alkalischen Bereich

Während natürliches Hämoglobin unter Versuchsbedingungen kaum verdaut wird, zeigen Azocasein und mit Harnstoff denaturiertes Hämoglobin hohe proteolytische Aktivität der purulenten Proteasen an. Gemäß Tabelle 1 hydrolysieren die mittels Filtration an DEAE-Sephadex gewonnenen Proteasen größtenteils denaturiertes Hämoglobin wesentlich rascher als Azocasein. Eine Ausnahme

davon stellt L-V (Abb. 4) dar, das im alkalischen Bereich Azocasein stärker verdaut. Dieses Verhalten ist vornehmlich einer Untergruppe, der durch weitere Reinigung an Sephadex G-100 gewonnenen Fraktion LV-1 (Abb. 5c), eigen (Tab. 2). Da Hämoglobin den besseren Aktivitätsindikator darstellt, wurde vornehmlich dieses für die Untersuchungen herangezogen.

b) im sauren Bereich

Mit Azocasein als Substrat zeigt sich, daß die Proteasengemische durchwegs im Alkalischen eine höhere proteolytische Aktivität aufweisen als im Sauren (Tab. 1). Auch die weiter gereinigten Proteasen besitzen dieses Verhalten. Hämoglobin dagegen wird von L-V (Abb. 4) im Sauren etwas stärker gespalten als im Alkalischen, eine Eigenschaft, die Kathepsine aufweisen.

3) Hemmbarkeit der proteolytischen Aktivität

a) mit niedermolekularem Bronchialsekretinhibitor im alkalischen pH-Bereich

Die Untersuchung hochaktiver purulenter Proteasen auf ihre Hemmbarkeit stellt einen wesentlichen Teil dieser Arbeit dar. Dazu wurden von den Proteasen, die genügend hohe Aktivität aufweisen und von denen ausreichende Mengen gewonnen werden konnten, Hemmkurven erstellt (s. Kapitel D 4). Die Hemmkurven zeigen die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von der Inhibitorenkonzentration. Werden diese Kurven auf den gleichen Ausgangswert bezogen (hier: ungehemmte Aktivität $\Delta E = 0,160$), so lassen sich

aus dem Kurvenverlauf die Proteasen miteinander vergleichen. Vor allem wird die maximale Hemmbarkeit der entsprechenden Fraktion ersichtlich.

Nach Chromatographie über DEAE-Sephadex ist das purulente Material noch nicht genügend gereinigt. Der erreichte Hemmgrad liegt bei rund 80 % (Abb. 7). Daraus aber läßt sich schließen, daß die erhaltenen Fraktionen noch immer ein Gemisch mehrerer Proteasen darstellen, das noch weiter auftrennbar ist. Dies zeigt die anschließende Chromatographie an Sephadex G-100 (Abb. 5) bzw. CM-Sephadex (Abb. 6). Mit Azocasein als Substrat läßt sich die Protease LV-1 zu 90 % hemmen (Abb. 8). LIV-3 wird zu 80 % gehemmt, LII-3 und LIV-1 zu 70 %. Die an Sephadex G-100 nicht weiter zu reinigende Fraktion L-I wird sowohl im Azocasein- als auch im Hämoglobintest (Abb. 9) nur ungenügend gehemmt (rund 50 %). Die stärkste Hemmung der Aktivität gegenüber Hämoglobin erfährt die Protease LIV-3 mit 88 % (Abb. 9). Die Protease LIII-1 ist nicht hemmbar. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Bakterienprotease. Nach Reinigung von L-I an CM-Sephadex (Abb. 6) gewinnt man eine weitere gut hemmbare Protease LI-4, die zu 89 % hemmbar ist (Abb. 10).

Eine weitere Gruppe von hochaktiven Proteasenkonzentraten wurde aus unzentrifugiertem Material (s. Kapitel D 3) gewonnen (Abb. 15). Nach Reinigung an DEAE-Sephadex (Abb. 13,14) erreicht man auch hier einen Hemmungsgrad

von 80 % (Abb. 16). Der höchste Hemmungsgrad von 90 % (Abb. 17) wird auch bei diesem Verfahren nach Reinigung der Proteasengemische an Sephadex G-100 (Abb. 15) erreicht.

b) im sauren pH-Bereich

Die Hemmkurven wurden mit Hämoglobin bei pH 5,5 erstellt (Abb. 11). Der Vergleich dieser Kurven mit denen bei pH 7,5 (Abb. 9,10 und 11) zeigt ähnliche Verläufe. Insgesamt läßt sich dabei feststellen, daß die Proteasen, die nach obiger Ausführung im sauren pH-Bereich weniger aktiv sind, etwas schwächer gehemmt werden. Am besten lassen sich die Proteasen LI-4 (86 %) und LIV-3 (84 %) hemmen.

c) Hemmung mit verschiedenen Inhibitoren (Abb. 12)

Zur Inhibition werden inter- α_1 -Trypsininhibitor, Harnininhibitor, α_1 -Anti-Trypsin und mit Maleinsäureanhydrid modifizierter Bronchialsekretinhibitor (s. Kapitel E 8) verwendet. Es zeigt sich, daß inter- α_1 -Trypsininhibitor und Harnininhibitor purulente Proteasen nicht zu hemmen vermögen.

Während mit Maleinsäureanhydrid modifizierter BSI die proteolytische Aktivität nur in geringem Ausmaß zu hemmen vermag (35 %), läßt sich mit α_1 -Anti-Trypsin eine Hemmung von rund 70 % erreichen.

D) Beschreibung der Versuche

1) Säulenchromatographie mit Cellulose

a) Auftrennung an p-Cellulose (Abb. 1)

Das purulente Konzentrat (s. Kapitel E 1) wurde mit p-Cellulose chromatographisch fraktioniert (Elutionspuffer 0,05m Borat; pH 6,5). Nach Erscheinen des 1. Peaks im Durchflußphotometer wurde die Ionenstärke des Elutionspuffers durch NaCl Zusatz schrittweise erhöht. Gleichzeitig wurde der pH erhöht:

L-I	0,05m Borat	pH 6,5	
L-II	0,05m "	0,1n NaCl	pH 6,5
L-III	0,05m "	0,5n NaCl	pH 7,5
L-IV	0,05m "	1,0n NaCl	pH 8,0

Von den vier gewonnenen Fraktionen war L-IV wegen zu geringer Menge für Aktivitätsbestimmungen nicht verwertbar.

Die Bestimmung der spezifischen proteolytischen Aktivität der einzelnen Fraktionen im sauren und im alkalischen pH-Bereich erfolgte mit dem Azocaseintest (s. Kapitel E 5). Dabei zeigte die Fraktion L-III keine meßbare Aktivität. Der Eiweißgehalt der beiden anderen Fraktionen betrug:

L-I	=	2,90mg Eiweiß/ml
L-II	=	0,45mg Eiweiß/ml

Ansatz: 0,5ml Proteasengemisch wird 3 std bei 37° C inkubiert; sodann gegen Leerwert gemessen; die Extinktion wird auf 1mg Protein berechnet:

L-I	=	E ₃₆₆	=	0,082/mg Protein
L-II	=	E ₃₆₆	=	0,057/mg Protein

Die proteolytische Gesamtaktivität verteilt sich zu 50 % auf L-I und zu 41 % auf L-II. Wegen der geringen proteolytischen Aktivität wurde auf die Erstellung einer Hemmkurve verzichtet.

b) Auftrennung an DEAE-Cellulose (Abb. 2)

Die Fraktion L-I wurde durch Dialyse entsalzt und gefriergetrocknet, sodann in 10ml Elutionspuffer (0,05m Na_2HPO_4 ; pH 8,0) gelöst und auf DEAE-Cellulose im gleichen Puffer aufgetragen.

Nach Elution des nicht absorbierten Materials wurde ein 2. Peak durch Erhöhung der Ionenstärke gewonnen.

LI-1 0,05m Na_2HPO_4 pH 8,0

LI-2 0,05m Na_2HPO_4 0,5n NaCl pH 8,0

Die beiden Proteasen enthaltenden Fraktionen wurden mit dem Azocaseintest auf ihre proteolytische Aktivität untersucht.

Ansatz: 2,5mg proteasehaltiges Material wird in 1,0ml TRA-Puffer gelöst; dann 1 std bei 37° C inkubiert und gegen Leerwert gemessen:

LI-1 = ΔE_{366} = 0,044/mg

LI-2 = ΔE_{366} = 0,034/mg

Diese beiden Fraktionen wurden auf ihre Hemmbarkeit untersucht. Als Inhibitor wurde angereicherter Bronchialsekretinhibitor (BSI) mit einem Inhibitorgehalt von 51,2 ImU/ml verwendet, als Substrat wurde Azocasein eingesetzt (s. Kapitel E 5).

Bronchialsekretinhibitor wurde in steigenden Mengen zugefügt:

BSI: 0,1ml; 0,2ml; 0,4ml; 0,5ml

Der erreichbare Hemmgrad beträgt für LI-1 12 %; für LI-2 27 % (s. Abb. 3).

2) Säulenchromatographie mit Sephadex

a) Auftrennung an DEAE-Sephadex (s. Abb. 4)

Das Ausgangsmaterial wurde auf DEAE-Sephadex aufgetragen (Elutionspuffer 0,05m Borat; pH 8,0). Das Erscheinen des 1. Peaks L-I auf der Uvicord-Kurve wurde abgewartet.

Durch Zusatz von Kochsalz in steigender Konzentration wurden weitere vier Fraktionen erhalten.

L-I	0,05m Borat	pH 8,0		
L-II	0,05m "	0,1n NaCl	pH 8,0	
L-III	0,05m "	0,2n "	pH 8,0	
L-IV	0,05m "	0,5n "	pH 8,0	
L-V	0,05m "	1,0n "	pH 8,0	

Die fünf Fraktionen wurden dialysiert und gefriergetrocknet.

Die proteolytische Aktivität wurde mit Azocasein, natürlichem Hämoglobin und, nachdem damit kaum meßbare Ergebnisse zu erzielen waren, mit denaturiertem Hämoglobin (s. Kapitel E 5) ermittelt. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte im alkalischen und im sauren pH-Bereich. Da TRA-Puffer mit Phenolreagens eine tiefblaue Färbung ergibt, mußten die mit TRA-Puffer angesetzten alkalischen Hämoglobinwerte im Ultravioletten (E_{280}) ohne Anfärbung gemessen werden. Später wurde alkalische Hämoglobinspaltung nur noch in 0,05m Borat-Puffer anstelle von TRA-Puffer durchgeführt.

Ansatz: 4,0mg Protease enthaltendes Material/ml Puffer (TRA-Puffer pH 7,8 bzw. 0,1m Citratpuffer pH 5,5) werden als zu bestimmende Substanz eingesetzt (Aktivitätsbestimmung s. Kapitel E 5). Bei 37° C wird 1 std inkubiert; die photometrische Messung erfolgt gegen Leerwert (s. Tab. 1).

b) Sephadex G-100 (Abb. 5)

Die gefriergetrockneten Fraktionen L-I bis L-V wurden jeweils in 10ml Elutionspuffer (0,05m Borat; 0,1n NaCl; pH 7,5) gelöst und auf Sephadex G-100 (im gleichen Puffer) aufgetragen. Die gewonnenen Fraktionen wurden im Druckdialyseverfahren entsalzt, dann gefriergetrocknet und schließlich in 6ml einer 0,1 %igen Na-Acid-Lösung als Bakteriostatikum gelöst. Na-Acid zeigte keinen Einfluß auf das Färbeverhalten bei den einzelnen Aktivitätsbestimmungen.

Proteolytische Aktivität der einzelnen Peaks s. Tab. 2

c) CM-Sephadex (Abb. 6)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fraktion L-I (DEAE-Sephadex), die sich durch Sephadex G-100 nicht weiter auftrennen ließ, auf CM-Sephadex aufgetragen. L-I wurde erneut in wenigen ml Elutionspuffer (0,05m Borat; pH 7,5) gelöst und auf CM-Sephadex gegeben. Nach Erscheinen des 1. Peaks (LI-1) wurde die Ionenkonzentration schrittweise erhöht. Es wurden fünf Fraktionen gewonnen:

LI-1	0,05m Borat	pH 7,5	
LI-2	0,05m "	0,1n NaCl	pH 7,5
LI-3	0,05m "	0,2n "	pH 7,5
LI-4	0,05m "	0,5n "	pH 7,5
LI-5	0,05m "	1,0n "	pH 7,5

Die proteolytische Aktivität der Fraktion ist aus
Tab. 3 ersichtlich.

- 3) Säulenchromatographie an Sephadex, jedoch mit unzentri-
fugiertem Ausgangsmaterial (Abb. 13 und folgende)
- Das homogenisierte Grundmaterial wurde gegen Wasser
dialysiert, jedoch nicht zentrifugiert, sondern in seiner
Gesamtheit gefriergetrocknet. Die Trockensubstanz wurde
sodann in 20ml Elutionspuffer (0,05m Borat; 0,5n NaCl;
pH 8,0) gelöst und über DEAE-Sephadex gereinigt. Unlös-
liche Substanzen verbleiben bei dieser Methode in der
Säule. Durch Erhöhung der Kochsalzkonzentration (1,0n
NaCl) wurde L-V gewonnen (s. Abb. 13), während das vor-
gereinigte Material (L-I bis L-IV) nun nach nochmaliger
Dialyse und Lyophilisierung an DEAE-Sephadex wie bisher
mit 0,05m Borat und steigender Kochsalzkonzentration ge-
reinigt wurde (s. Abb. 14):

L-I	0,05m Borat	pH 8,0	
L-II	0,05m "	0,1n NaCl	pH 8,0
L-III	0,05m "	0,2n "	pH 8,0
L-IV	0,05m "	0,5n "	pH 8,0

Die Aktivitätsverteilung ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

Der Vergleich der Uvicord-Kurven (s. Abb. 4 und 14)

zeigt einen gänzlich neuen 1. Peak:

Vorlauf LI-1 und eigentlicher Peak LI-2. Die Hemmkurven wurden mit Hämoglobin als Substrat und Bronchialsekretinhibitor = 97 ImU/ml erstellt (s. Abb. 16).

Die Fraktionen LI-1 und LI-2 wurden dialysiert und gefriergetrocknet. Die Trockensubstanzen wurden in je 10ml 0,05m Borat pH 8,0 gelöst und über Sephadex G-100 fraktioniert (s. Abb. 15).

Die erhaltenen Fraktionen (LI-1a bis d und LI-2a bis d) wurden druckdialysiert und gefriergetrocknet. Die proteolytische Aktivität wurde mit dem Hämoglobintest ermittelt. Um Material zu sparen, wurde fünf Stunden inkubiert (s. Tab. 5). Die Hemmkurven wurden mit Bronchialsekretinhibitor = 90,7 ImU/ml erstellt (s. Abb. 17).

4) Hemmkurven

Die Hemmversuche wurden mit verschiedenen Substraten (Azocasein und denaturiertes Hämoglobin) im alkalischen und sauren pH-Bereich und mit mehreren Inhibitoren durchgeführt. Die einzelnen Kurven wurden jeweils auf den gleichen Ausgangswert ($\Delta E = 0,160$) bezogen.

Die Inhibitoren wurden unmittelbar vor Erstellung der Hemmkurven mit dem Trypsintest auf ihren Hemmwert geprüft (s. Kapitel E 4). Die Werte wurden jeweils gegen einen Leerwert, der nach sofortiger Unterbrechung der Reaktion mit den übrigen Testwerten inkubiert wurde, gemessen (s. auch Kapitel E 7).

Die Inhibitor Kapazität ist bei den jeweiligen Kurven angegeben. Die eingesetzten Proteasen waren auf Grund vorheriger Aktivitätsbestimmungen jeweils so bemessen, daß ihre ungehemmte Aktivität ungefähr den Bezugspunkt ($\Delta E = 0,160$) erreichte.

E) Material und Methoden

1) Proteasen

Das bei Spülungen von Kieferhöhlen gewonnene purulente Material wird mit Wasser im Zellhomogenisator aufgeschlossen und gegen Wasser dialysiert. Nach Zentrifugation (10 Min.; 3000 U/min) wird der Überstand entnommen und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in wenigen ml Boratpuffer (0,05M Borat; pH je nach Bedarf) gelöst und steht nun als Ausgangsmaterial für die verschiedenen Fraktionierungsmethoden zur Verfügung.

2) Säulenchromatographie

Als Säulenfüllung dienen:

p-Cellulose	Pharmacia	Uppsala	Säule 1,7 x 175cm
DEAE-Cellulose	"	"	" 1,7 x 175cm
DEAE-Sephadex	"	"	" 2,9 x 30cm
Sephadex G-100	"	"	" 1,7 x 175cm
CM-Sephadex	"	"	" 2,9 x 30cm

Das zu fraktionierende Lyophilisat wird in wenigen ml des entsprechenden Elutionspuffers gelöst und mit einer Pipette gleichmäßig auf die gewünschte Säule aufgetragen und mit dem jeweiligen Puffer eluiert.

Die jeweiligen Elutionspuffer werden bei den Versuchsbeschreibungen angegeben.

3) Dialyse

Das purulente Homogenat wird in einen Dialyseschlauch eingefüllt, dieser sodann erst 24 std. in fließendes

Wasser, anschließend 12 std. in destilliertes Wasser re-
hängt. Die Dialyse der Unterfraktionen erfolgt mittels
Druckdialysekammer. Durch mehrmalige Zugabe destillierten
Wassers wird dabei das Material entsalzt.

4) Inhibitorbestimmung

Zur Bestimmung des Hemmwertes eines Inhibitors dient der
Trypsintest. Die Hemmkapazität wird in ImU (Inhibitor-
miliunits) pro mg Protein angegeben. Eine ImU ist die-
jenige Inhibitormenge, die die hydrolytische Wirkung von
0,001mg Trypsin gegen N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-
anilid aufhebt.

Trypsintest

Prinzip: Trypsin spaltet aus N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-
p-nitroanilid gelb gefärbtes p-Nitroanilin ab. Die Extink-
tionsänderung von 0,0033/min bei 25° C repräsentiert im
Standardansatz 1mU Trypsin.

1. Trypsinlösung: 5mg werden in 100ml 0,00125n HCl gelöst

2. Triäthanolaminpuffer (TRA-Puffer): 18,6g TRA und 7,35g
CaCl₂·xH₂O werden in 450ml H₂O gelöst, mit 2n NaOH auf
pH 7,8 eingestellt und mit H₂O auf 500ml aufgefüllt.

3. N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid:

100mg werden in 100ml H₂O bei 95° C gelöst.

Ansatz: Inhibitor + TRA-Puffer = 1,8ml

Trypsin = 0,2ml

5 min. bei 25° C in Küvetten inkubieren.

Anschließend wird 1ml N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-
p-nitroanilid zugegeben.

Nach jeweils 1 Min. wird der Extinktionswert abgelesen (Leerwert ohne Inhibitor). Photometrische Messung bei 405nm

Berechnung der ImU:

$$\frac{\text{Leerwertdifferenz} - \text{Hemmwertdifferenz}}{3,33 \times \text{Verdünnung}} = \text{ImU/ml}$$

Das optimale Ergebnis erhält man bei einer Hemmung von 50 %.

Trypsin: Merck, TPCK - behandelt

5) Aktivitätsbestimmung

a) Azocaseintest

Prinzip: Proteasen spalten säurelösliche Peptide aus Azocasein ab. Diese sind gelb gefärbt. Die Färbung des Überstandes nach Enteiweißung ist ein Maß für die Aktivität der Proteasen.

Substrat: 2 %iges Azocasein wird in Puffer unter vorsichtiger Erwärmung gelöst. Diese Lösung wird täglich neu hergestellt. Als Puffer kommen je nach pH TRA- oder Citratpuffer zur Anwendung.

Ansatz: Proteasehaltiges Material + Puffer = 1,0ml
Azocasein = 2,0ml

Die Reaktion wird durch Zugabe von 3,0ml 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach einer Zentrifugation von 10 Min. bei 3000 U/min. erfolgt die photometrische Messung des Überstandes bei 366nm.

Puffer: Im alkalischen Bereich Triäthanolaminpuffer (TRA): 0,2m TRA; 0,1m CaCl_2 ; pH 7,8

Im sauren Bereich: Citratpuffer 0,1n Citrat; pH 5,5

Azocasein: Serva

b) Hämoglobintest

Prinzip: Hämoglobin wird durch Harnstoff in alkalischer Lösung denaturiert. Durch Proteolyse werden daraus Peptide abgespalten, die in Trichloressigsäure löslich sind und deren Konzentration durch Umsetzung der Tyrosin- und Tryptophan-reste nach dem Verfahren von Folin und Ciocalteu bestimmt wird.

Der optimale Meßbereich liegt bei pH 7,0 - 8,0

Substrat: 2,0g Hämoglobin werden in 50,0ml H_2O gelöst, anschließend werden 36,0g Harnstoff und 4,0ml 2n NaOH zugefügt. Schließlich wird mit H_2O auf 60,0ml aufgefüllt.

Die Lösung wird 30 - 60 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nun werden 10,0ml Borsäure folgender Zusammensetzung zugegeben:

0,6g Borsäure und 0,3g Kochsalz werden mit Wasser auf 100,0ml aufgefüllt.

Die Lösung wird kräftig geschüttelt, bis Hämoglobin und Borsäure gut gemischt sind. Sodann werden 4,4ml 5 %ige $CaCl_2$ -Lösung zugegeben.

Nach Einstellen auf pH 7,5 wird mit Wasser auf 100,0ml ergänzt.

Ansatz: Proteasehaltiges Material + 0,05m Boratpuffer
pH 7,5 = 0,5ml

Substrat (Hämoglobin) = 2,5ml

Die Reaktion wird mit 5ml 5 %iger Trichloressig-

säure gestoppt. Bei 3000 U/min wird 10 Min. zentrifugiert, anschließend filtriert. Zu 2,5ml Filtrat werden 5ml 0,5n NaOH und 1,5ml Folinreagens zugegeben.

Nach nochmaliger Zentrifugation wird bei 578nm der Überstand photometrisch gemessen.

Hämoglobin: Serva

6) Eiweißstandard

Um den Eiweißgehalt einer Lösung zu ermitteln, wird mit Hilfe von Standardlösungen aus der Extinktionsdifferenz der Eiweißgehalt berechnet:

Ansatz: Zu bestimmende Lösung	=	0,1ml
Standard 0,05mg Eiweiß	=	0,1ml
Standard 0,10mg Eiweiß	=	0,1ml
Standard 0,15mg Eiweiß	=	0,1ml

Dazu werden jeweils 1,0ml 2,5n NaOH gegeben. Im Wasserbad werden die Lösungen bei 100° C 60 Min. inkubiert. Anschließend werden die Reaktionen mit je 1,0ml 30 %iger Essigsäure gestoppt und mit 2,0ml Ninhydrin angefärbt. Nach erneutem 15 minütigem Wasserbad werden 10,0ml 50 %iges Propanol-1 zugegeben. Nun erfolgt die photometrische Messung bei 578nm.

Berechnung: Die Extinktion der Standardwerte wird auf 0,1mg Eiweiß umgerechnet. Daraus wird der Mittelwert gebildet. Aus der Extinktion der zu bestimmenden Lösung läßt sich im Vergleich zum Mittelwert der Eiweißgehalt berechnen.

7) Erstellung von Hemmkurven

Prinzip: Gleichen Mengen proteasehaltigen Materials werden steigende Mengen eines Inhibitors beigefügt. Die jeweils verbleibende Restaktivität wird mit dem Azocasein- oder Hämoglobintest ermittelt. Die abfallende Aktivität in Bezug auf die steigende Menge Inhibitor läßt sich in einer Kurve grafisch darstellen.

Substrat: Azocasein oder Hämoglobin

Ansatz:

Nullwert: Proteasenkonzentrat + Puffer + Substrat,
kein Inhibitor

Hemmwerte: Proteasenkonzentrat + Puffer + Substrat
+ Inhibitor (ansteigend 0,1ml; 0,4ml...)

Leerwert: Proteasenkonzentrat + Puffer + Substrat
+ höchste InhibitorKonzentration, mit 3,0ml
5 %iger Trichloressigsäure sofort gestoppt.

Sämtliche Werte werden im Wasserbad bei 25° C bzw. 37° C inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich nach der zur Verfügung stehenden Proteasenmenge, sodaß die Extinktion für den Wert ohne Inhibitor $\Delta E \approx 0,160$ beträgt.

Inhibitoren:

Bronchialsekretinhibitor (BSI)

Inter-alpha₁-Trypsininhibitor Behringwerke Marbg./Lahn
Harninhibitor Labor Dr. Hochstraßer

alpha₁-Anti-Trypsin Behringwerke Marburg/Lahn
mit Maleinsäureanhydrid modifizierter Bronchialsekret-
inhibitor (s. nächsten Abschnitt) Labor Dr. Hochstraßer

8) Inhibitormodifikation des Bronchialsekretinhibitors

Bronchialsekretinhibitor wird in 0,05m Boratpuffer pH 8,0 gelöst. Bei 0° C wird Maleinsäureanhydrid langsam zugegeben. Mit dem pH - Meter wird der pH - Wert ständig kontrolliert und durch Zugabe von 2n NaOH konstant gehalten. Die Modifikation wird im Eisbad durchgeführt, um die Temperatur von 0° C zu gewährleisten.

F) Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wird über die Hemmung proteolytischer Aktivität purulenten Materials durch Proteaseninhibitoren berichtet.

Die für die Versuche gewonnenen Proteasenkonzentrate entstammen den Sekreten, wie sie bei Spülungen der Kiefernebenhöhlen gewonnen werden. Die verschiedenen Fraktionierungsmethoden des Ausgangsmaterial zeigen, daß Säulenchromatographie mit Cellulose als Säulenfüllung nur zu ungenügend hohem Reinigungsgrad der Proteasengemische führen. Für die gewünschten Hemmversuche eignet sich dagegen die schrittweise chromatographische Reinigung des purulenten Sekrets mit Sephadex. Im Verlauf der Untersuchung wird gezeigt, daß mit Sephadex sogar das lediglich konzentrierte, jedoch nicht zentrifugierte ursprüngliche purulente Material gereinigt werden kann.

Die mit den physiologischen Inhibitoren α_1 -Anti-Trypsin und Bronchialsekretinhibitor erreichten Hemmgrade liegen bei 70 % bzw. 90 %, während weder mit den in dieser Arbeit untersuchten sonstigen Inhibitoren noch mit anderen bisher diesbezüglich überprüften Inhibitoren ein zufriedenstellender Hemmgrad erreicht wurde.

G) Diskussion

Die proteolytische Aktivität in purulenten Sekreten ist größtenteils auf das Vorkommen von leukozytären Proteasen zurückzuführen. Über die Rolle proteolytischer Enzyme bei der Pathogenese von Entzündungen wurde in der Einleitung kurz eingegangen. Ebenso darf die Schutzfunktion humoraler und schleimhautspezifischer Proteaseninhibitoren als gegeben angesehen werden.

Bei den bisherigen Untersuchungen zwischen Proteasen und Inhibitoren im Bereich der Schleimhaut der oberen Atemwege fand sich, daß bei physiologischen Funktionszustand der Schleimhäute in deren Sekreten keine proteolytische Aktivität, sondern antiproteolytische Aktivität feststellbar ist (10). Bei akuten Infektionen der oberen Luftwege erscheint in den Sekreten proteolytische Aktivität, während die antiproteolytische Aktivität verschwindet (12). Die Proteasenwirkung während akuter Infektionen ist durch physiologische, d.h. leukozytenspezifische Inhibitoren zu 90 % hemmbar. In den Sekreten chronisch entzündeter Schleimhäute dagegen erscheinen Proteasen, die durch diese Hemmstoffe nicht inhibiert werden.

Die in dieser Untersuchung verwendeten Sekrete stammen jeweils von mehreren Patienten, d.h. von akut und chronisch entzündeten Schleimhäuten. Das Sammeln dieser Sekrete war notwendig, um möglichst große Mengen purulenten Materials zur Verfügung zu haben. Das dadurch gewonnene breite

Proteasenspektrum konnte durch unterschiedlichen Inhibierungsgrad der einzelnen Proteasenkonzentrate charakterisiert werden. Auf das einzelne pathologische Sekret bezogen heißt dies, daß bei genügend empfindlicher Methodik es gelingen müßte, durch die inhibitorische Charakterisierung der Proteasen aus purulenten Sekret durch spezifische Inhibitoren einen "aktuellen Status" des Entzündungsgeschehens in den Schleimhäuten festzulegen.

Als therapeutische Konsequenz ergibt sich, daß derzeit bei akuten Infektionen, zumindest bei sehr schweren Krankheitsbildern, physiologische Inhibitoren (α_1 -Anti-Trypsin bzw. Bronchialsekretinhibitor), die zur Zeit noch schwer zu gewinnen sind, eingesetzt werden können, um den verlorengegangenen Schutz der Schleimhaut künstlich aufrecht zu erhalten, bis die Eigensekretion von Bronchialsekretinhibitor wieder genügend hohen Inhibitorgehalt erreicht. Für chronische Krankheitsbilder bietet sich derzeit keine therapeutische Möglichkeit durch Inhibitoren an. Aber gerade durch die in der vorliegenden Untersuchung aufgeführten Darstellungsverfahren von Proteasenkonzentraten genügend hoher Reinheit wird die gezielte Suche nach entsprechenden Inhibitoren ermöglicht.

Literaturangaben

1. Karlson P.

Biochemie 128-132 (1966) Stuttgart

2. Kopitar M., Kregar I., Lebez D.

Enzymologie 41, 129 (1971)

3. Frey E. K., Kraut H., Werle E.

Das Kallikrein-Kinin-System u. seine Inhibitoren
(1968) Stuttgart

4. Siegenthaler W.

Klin. Pathophysiologie 719-721 (1970) Stuttgart

5. Hochstraßer K., Haendle H., Reichert R., Werle E.

z. physiol. Chem. 352, 954 (1971)

6. Schultze H. E., Göllner I., Heide K., Schönberger E.,
Schwick G.

z. Naturforsch. 10b, 463 (1955)

7. Hochstraßer K., Schuster R., Reichert R., Heimbürger N.,

z. physiol. Chem. 353, 1120-1124 (1972)

8. Schultze H. E., Heide K., Haupt H.

Klin. Wochenschr. 40, 427 (1962)

9. Frity N., Tschesche H.

Proceedings Int. Res. Conf. on Proteinase Inh.

10. Reichert R., Hochstraßer K.

z. Laryng. Rinol. 51, 190, 73-80 (1972)

11. Hochstraßer K., Matzner M.

Über die Hemmung leukozyitärer Proteasen durch einen
niedermolekularen Inhibitor (1973)

12. Reichert R., Hochstraßer K., Conradi M.

z. Pneumologie 147, 13-20 (1972)

Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann, Direktor der Hals- Nasen-
Ohrenklinik der Universität München, danke ich für die
Überlassung eines Arbeitsplatzes an seiner Klinik.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. K.
Hochstraßer sagen, für die Bereitstellung des Themas
und des Laborplatzes, für viele Diskussionen, Anregun-
gen und Hilfen.

Lebenslauf

Geboren: 2.10.1946 in München

Vater: Rudolf Ellgas

Mutter: Julie Ellgas geb. Reimertshofer

1953 - 1955: Volksschule München Dom-Petro-Platz

1955 - 1957: Volksschule München Albrechtstr.

1957 - 1966: Rupprecht Gymnasium in München

WS 1966/67: allgem. Nat. an der Universität
München

1967 - 1968: Bundeswehr

1968 - 1974: Medizinstudium an der Universität
München

16.12.1974: Staatsexamen in München

1975: Medizinalassistent am Kreiskranken-
haus Trostberg

10.2.76: Approbation als Arzt

seither: Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus
Trostberg

Wolfgang Heribert Ellgas

